

Aus dem Kinderspital Basel

Verhalten und Bedeutung der Blut-Citronensäure bei Rachitis

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Trudi Ochsé

von Dättwil (Aarg.)



1949

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von
Herrn Prof. Dr. E. Freudenberg

Tag der Promotion: 9. Juli 1948

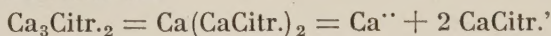


Sonderdruck aus «Annales Paediatrici», Vol. 172, Nr. 3

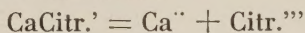
Da die Citronensäure in den meisten Geweben vorhanden ist, wurde schon ziemlich früh ihr Gehalt und ihre Aufgabe im Organismus untersucht. *Piotrowski* und *Magawly* (1887) beschäftigten sich als erste mit dem Stoffwechsel der Citronensäure. Sie kamen zum Ergebnis, daß sie im Körper ganz abgebaut werde. *Sabatini* (1901) konstatierte einen Zusammenhang zwischen Citronensäure- und Kalkwirkung im Organismus. Citrat verhindert die Blutgerinnung. Dieses Phänomen suchte er mit einer chemischen Komplexbildung zwischen Citronensäure und Kalk zu erklären. Diese Hypothese wurde erst wieder aufgegriffen, als die Citronensäure in ihren Beziehungen zum Calcium im Organismus studiert wurde: *Hastings, Murray* und *Sendroy* (1926) untersuchten die Löslichkeit von CaCO_3 in Citratlösungen. Dabei zeigte es sich, daß je nach der Konzentration der Citratlösung die Löslichkeit des CaCO_3 variiert. Diese Tatsache konnte nicht mit einer Übersättigung der Lösung erklärt werden. Daher nahmen die Autoren eine Verbindung der Citronensäure und des Ca zu einem Ca-Citronensäure-Komplex an. Da die Citronensäure auch im Blut gefunden wird, soll sie die Kalksalze in Lösung halten. Nachdem zuerst *Rona* und Mitarbeiter durch die Methode der Kompensationsdialyse analoge Befunde erhoben hatten, stellten *Shelling* und *Maslow* (1928) und viele andere Autoren fest, daß im normalen Blut ca. 50 % des Ca ultrafiltrierbar sind. Wenn dem Blut aber Citronensäure zugegeben wird, sind es nach *Shelling* und *Maslow* ca. 100 %. Diese Vermehrung des ultrafiltrierbaren Ca soll durch die Bildung eines löslichen, nichtionisierten Ca-Citronensäure-Komplexes zustande kommen. Auch *Greenberg* (1931) zieht die Möglichkeit eines solchen Komplexes in Betracht. Er gibt zu Kaninchenblut Citronensäure und stellt dabei fest, daß um so mehr Ca zur Anode wandert, also elektronegativer wird, je mehr Citronensäure zugegeben wird. An-

dere Autoren, wie *Brull* (1931), *Greenwald* (1926), *Klinke* (1928), nehmen in ihren Arbeiten ebenfalls einen Ca-Citronensäure-Komplex an. *Hastings* (1934) befaßt sich näher mit diesem Komplex, indem er folgende Theorie aufstellt:

1. Dissoziation:

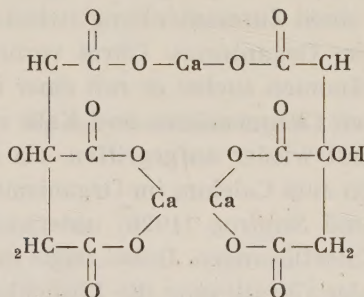


2. Dissoziation:



Um dies zu beweisen, wurden Versuche mit Lösungen von Ca und Citronensäure gemacht und nach der Formel: $\frac{[\text{Ca}^{++}] \cdot [\text{Cit.}''']}{[\text{CaCit.}']}$

= K die Konzentration von Ca^{++} festgestellt. — Da in der zweiten Dissoziation fast keine Ca-Ionen festgestellt werden konnten, muß das Ca im postulierten negativen Ca-Citronensäure-Komplex vorhanden sein, für den *Hastings* folgende Strukturformel aufstellt:



Da die Citronensäure nach den obigen Versuchen eine bestimmte Rolle im Ca-Stoffwechsel zu spielen scheint, wurden mit ihr Versuche bei Rachitikern gemacht: *Hamilton* und *Dewar* (1931) heilten mit Citronensäure und Citrat Rattenrachitis. Nach *Nikolaysen* beruht die Rattenrachitis auf einer Störung des Ca/P-Verhältnisses im Darm, d. h. je nach der Konzentration von Ca und P können im Darm unlösliche Ca-Phosphate auftreten, die nicht mehr resorbiert werden können. Deshalb glaubt *Hamilton* mit Citronensäure die Ca-Konzentration ändern zu können, indem Ca in einen löslichen Ca-Citronensäure-Komplex überführt wird. Dieser soll nach *Hamilton* durch eine Änderung der H-Ionen-Konzentration das Verhältnis Ca/P im Darm so ändern, daß wieder mehr Ca resorbiert werden könnte. *Hathaway* (1939) verfüttert rachitischen Ratten Citronensäure. Dabei wird eine vermehrte Kalkablagerung im Knochen festgestellt, und zwar mit Citronensäure um 4 %, mit Citronensäure + K-Citrat um 14—16 %. *Day*

(1940) erhält nur dann vermehrte Verkalkung bei Zufütterung von Citronensäure, wenn in der Diät das Verhältnis Ca/P hoch ist. Deshalb bezweifelt dieser Autor den Verkalkungseffekt der Citronensäure als physiologischen Vorgang. *Shohl* und *Buttler* (1939) wandten die Citronensäure auch bei der Säuglingsrachitis an und erzielten Erfolge. *Rominger* (1944) verhütet mit Citronensäure die Rattenrachitis. Er glaubt, daß eine rachitogene Kost durch Citronensäure in eine rachitisverhütende verwandelt werden könne. Auch bei der Säuglingsrachitis erzielt der Autor Heilungen mit Citronensäure, und zwar in 3—6 Wochen, wenn täglich 8—10 g Na-Citrat, also eine sehr große Menge für einen Säugling, gegeben wird. Zur Erklärung zieht er den Ca-Citronensäure-Komplex heran. Durch diesen soll die Bildung unlöslicher Ca-Phosphate verhindert und gleichzeitig die Ca-Resorption gefördert werden. Auch Vitamin D wirke in derselben Richtung nach *Nikolaysen*. Also werden Vitamin D und Citronensäure einander dem Sinne ihrer Wirkung nach gleichgestellt. *Glanzmann* (1946) zeigte röntgenologische und histologische Heilungen von Rattenrachitis. Nach ihm dürfen nicht weniger als 5 % Citronensäure im Futter gegeben werden, da sonst keine völlige Heilung der Rachitis eintritt. Der Autor sieht in der Kraniotabes des Säuglings ein Testobjekt für die Wirkung der Citronensäuretherapie, die er mit Citratblut (Transfusionen) und Citronensäure oral durchführt. Diejenigen Fälle, die nicht heilen, bezeichnet er als citronensäureresistente Rachitis. Diese sollen jedoch nur in kleiner Zahl auftreten. Auch *Glanzmann* glaubt an das Bestehen des *Hastings*-Komplexes im Darmkanal. Jedoch nicht so, daß dieser die Resorption im Darm verbessere, sondern eher die Bindung des Ca an die Fettsäuren der Kuhmilch als Kalkseife verhindere. Als Indikation zur Citronensäuretherapie gibt *Glanzmann* an:

1. kalkarme Formen der Rachitis;
2. Vi-De-resistente Rachitis;
3. gewöhnliche P-arme Rachitis.

Heinz und *Rominger* (1947) sehen die Citronensäure gemäß den Versuchen an rachitischen Ratten als antirachitogen an, und zwar glauben auch sie an den löslichen, nichtionisierten *Hastings*-Komplex. Durch seine Bildung soll das Verhältnis Ca/P verändert werden, d. h. die Löslichkeit des Ca wird verbessert. Dadurch können Ca-Niederschläge im Darm aufgelöst werden. Ca, das sonst ausgeschieden worden wäre, kann jetzt wieder resorbiert werden.

Also besteht die Wirkung der Citronensäure in einer Verbesserung des Ca-Transportes (das Ca soll in der Komplexform durch das Blut an den Knochen herangebracht werden) und einer Förderung der Ablagerung im Knochen. Die Verhältnisse bei der Rachitis werden von den Autoren folgendermaßen erklärt: Es bestehe eine primäre Ca-Störung (*Albright*). Es werde vermehrt unlösliches Ca im Darm ausgeschieden. Durch diese geringe Ca-Resorption werde die Konstanz des Serum-Ca in Frage gestellt. Um dies zu verhüten, werde Parathormon ausgeschüttet, was wieder seinerseits eine Ausscheidung von P durch die Nieren nach sich ziehe. Dies führe in weiterer Folge zu einer Hypophosphatämie. Diese Hypophosphatämie mobilisiere durch Unterschreiten des Löslichkeitsproduktes Ca/P Ca-Ionen, und zwar auf Kosten des Knochen-Ca, d. h. das Knochen-Ca werde preisgegeben, wenn die Konstanz des Serum-Ca in Frage gestellt sei. So komme es zu einer Entkalkung, beziehungsweise Verkalkungshemmung im Knochen. Wenn die Ca-Exkretion weiter andauere, genüge die Regulation durch das Parathormon nicht mehr, es komme zu einem Abfall des Serum-Ca (Tetanie). *Rominger* fand im Blut Erwachsener 2,5—3,5 mg% Citronensäure. Diese Werte sind zu klein, als daß die Citronensäure in der Komplexform den ganzen Ca-Stoffwechsel regulieren könnte. Die genannte Menge Citronensäure genügt auch nicht, um den Lösungszustand des gesamten ultrafiltrablen Kalks zu erklären. Daher glauben die Autoren, daß der Citronensäure-Komplex als Hilfssystem gelegentlich eingeschaltet werden könne. Andere Autoren untersuchten die Mengen an Citronensäure in den verschiedenen Geweben:

Nordbö und Scherstén (1931) fanden im Plasma: 2,5—3,4 mg% Citronensäure, im Serum 2,0—3,6 mg%. Die Blutkörperchen sollen auf Grund einer Untersuchung keine Citronensäure enthalten. *Pucher* (1936) untersuchte Hundeblut: Vollblut enthält 0,6—1,9 mg% Citronensäure, die Blutkörperchen haben relativ hohe Werte: 1,13 mg%. *Hallmann* (1940) stellt in den meisten Geweben gleichviel Citronensäure fest wie im Blut: 1,5—2,9 mg%. Als «Citronensäuredepot» wird von ihm die Schilddrüse angesprochen, da sie relativ viel enthalte, nämlich 123 mg%. Auch untersucht der Autor den Abbau der Citronensäure in den einzelnen Geweben, indem er die spaltenden Enzyme feststellt. Interessant ist, daß im Blut kein Enzym gefunden wurde. Also muß die Regulierung der Citronensäure im Blut durch die übrigen Gewebe erfolgen. *Dickens* (1941)

machte Citronensäurebestimmungen an Tumoren und embryonalem Gewebe. Tumorgewebe enthält viel Citronensäure (Ratten-carcinom: 12—18 mg%, Menschen-carcinom: 8,8 mg%). Woher stammt jedoch die Citronensäure in all den Geweben? Einen Teil davon bilden, wie bekannt ist (Citronensäurezyklus), die Gewebe selbst. *Dickens* beantwortet die Frage des Vorkommens der Citronensäure in den Geweben durch folgende Untersuchungen:

Er findet: Haare 10 % der Gesamtcitronensäure

Samenblase 5 % » »

Knochen 70 % » »

Das embryonale Gewebe enthält auch viel Citronensäure, die jedoch wahrscheinlich nur provisorisch eingelagert ist, da beim Erwachsenen bis zu 70 % im Knochen sind. Dies weist auf einen Zusammenhang mit dem Ca-Stoffwechsel hin. Der gleichen Ansicht ist auch *Thunberg* (1941), der im Samen und in den Eierschalen verschiedener Vögel neben hohen Citronensäurewerten auch hohe Ca-Werte findet. *Rominger* (1944) weist im Knochen 500 mg% Citronensäure nach. Bei rachitischen Tieren soll ihr Gehalt im Knochen geringer sein als bei gesunden (*Dickens*).

Die Citronensäurebestimmung im Blut.

Die erste spezifische Citronensäurebestimmung wurde von *Stahre* (1897) durchgeführt. Mit KMnO_4 entstand eine braune Färbung durch Bildung von Pentabromaceton. *Thunberg* arbeitete eine biologische Methode aus. Dabei wird Citronensäure durch Dehydrogenase oxydiert, wobei das zugefügte Methylblau in die Leukoform übergeführt wird. Jedoch ist die Methode ziemlich schwierig, sodaß unzuverlässige Werte entstehen. Erst *Pucher* zeigte einen Weg, um ziemlich genaue Analysen machen zu können. Zur Zeit, da diese Arbeit schon begonnen worden war, erschien eine Arbeit über Mikrobestimmung der Citronensäure von *Taussky* u. *Shorr* (1947). Deshalb konnte sie nicht mehr berücksichtigt werden. Die Methode basiert auf Pentabromaceton und NaJ, welche zusammen einen gelben Komplex bilden. Die Genauigkeit der Methode geht von 10 bis 60 γ als Grenzen ihrer Anwendbarkeit.

Methode nach Pucher.

Prinzip: Die Citronensäure wird mit Br und KMnO_4 zu Pentabromaceton oxydiert. Dieses wird mit Petroläther ausgezogen. Mit Na_2S entsteht nachher eine gelbe Farbe, die durch Pyridin stabilisiert wird.

Durchführung der Blutanalyse: Blut, wenn möglich mehr als 2 ccm, wird in einem Gefäß gesammelt, das etwa 50 mg Na-Fluorid enthält. Es muß beim Zufießen des Blutes kräftig umgerührt werden, damit keine Gerinnsel entstehen. Nun wird 1 Volumen Blut mit 7 Volumina 10%iger Trichloressigsäure enteiweißt und ca. $\frac{1}{2}$ Stunde stehengelassen. Dann wird filtriert. Das Filtrat

wird nun auf 70 ccm mit Aqua dest. verdünnt, 3 ccm H_2SO_4 (50 %) zugegeben (zur Entfernung von Verunreinigungen), in einem Becherglas mit einigen Siedesteinchen gekocht und auf ca. 40 ccm eingedampft. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur werden ca. 3 ccm gesättigtes Bromwasser zugegeben und 10 Min. stehengelassen. Dann kommt die Flüssigkeit in einen Schütteltrichter. 2 ccm KBr (11,9 %) + 10 ccm KMnO_4 (4,74 %) werden zugegeben und wieder 10 Min. gewartet. Darauf wird das Ganze mit FeSO_4 (20 %) entfärbt — die Flüssigkeit ist nun strohgelb. Jetzt wird mit 25 ccm Petroläther geschüttelt, um das Pentabromaceton auszuziehen. Die Restflüssigkeit wird in ein Gefäß abgelassen und der Petroläther 2mal mit Aqua dest. gewaschen. Das Waschwasser wird mit der Restflüssigkeit vereint und in einem 2. Schütteltrichter nochmals mit Petroläther ausgezogen und 2mal gewaschen. Nun werden die beiden Petrolätherphasen vereint und nochmals 3mal mit Aqua dest. gewaschen. In einem 10-ccm-Zylinder wird 3,5 ccm Pyridinum purissimum abgemessen. Die Petrolätherphase zieht man nun nacheinander mit 3,2 und 1 ccm Na_2S (4 %) aus, indem man die gelblich gefärbte Na_2S -Phase ins Pyridin ablaufen läßt. Mit Pyridin (50 %) wird im Zylinderchen bis zur Marke 10 aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird nun eine halbe Stunde stehengelassen, um dann mit dem Stufenphotometer mit Filter 43 photometriert zu werden. Beim Photometrieren ist die Intensität der Farbe proportional dem vorhandenen Pentabromaceton.

Bei der Analyse muß scharf darauf geachtet werden, daß alle Bromine durch FeSO_4 entfernt werden, d. h. es muß genügend FeSO_4 zugegeben werden, da diese auch im Petroläther löslich sind und einen höheren Wert hervorrufen können. Besonders sorgfältig muß das Auswaschen des FeSO_4 geschehen, denn die kleinsten Spuren geben mit Na_2S einen Niederschlag und verfälschen die Schlußwerte, indem sie diese um ein Vielfaches erhöhen können. Auch muß Pyridinum purissimum verwendet werden, da schon Pyridinum purum durch seine leichte Eigenfarbe erhöhte Leerwerte gibt.

Vorversuche.

Um bei den eigentlichen Blutanalysen möglichst genaue Werte zu erhalten, wurden folgende Versuche angestellt:

a) *Versuche mit reiner Citronensäure:* Es wurden verschiedene Konzentrationen im Versuch eingesetzt und so genau als möglich wieder bestimmt:

Zugegebene Citronensäure:	Gefundene Citronensäure:
0,050 mg	0,050 mg
0,050 mg	0,050 mg
0,050 mg	0,050 mg
0,050 mg	0,050 mg
0,050 mg	0,050 mg
0,050 mg	0,052 mg
0,050 mg	0,049 mg

0,050 mg	0,051 mg
0,050 mg	0,050 mg
0,050 mg	0,050 mg
0,10 mg	0,10 mg
0,10 mg	0,10 mg
0,10 mg	0,099 mg
0,10 mg	0,101 mg
0,10 mg	0,101 mg
0,10 mg	0,10 mg
0,20 mg	0,20 mg
0,20 mg	0,20 mg
0,20 mg	0,199 mg
0,20 mg	0,201 mg
0,20 mg	0,201 mg
0,20 mg	0,20 mg

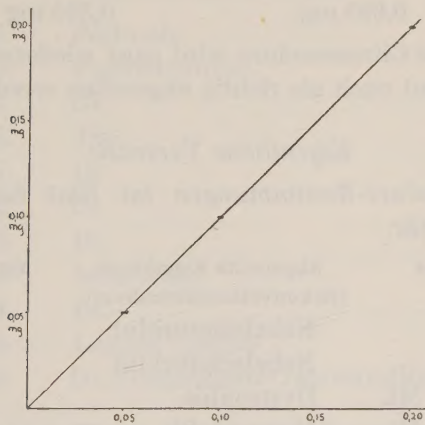
Die Fehlerwerte werden nach folgender Formel berechnet:

$$\gamma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$$

Danach wird mit folgender Genauigkeit gearbeitet:

0,050	± 0,00081 mg
0,10	± 0,00077 mg
0,20	± 0,00077 mg

mg Citronensäure



Extinktion

Eichkurve für Citronensäurebestimmungen.

b) *Hemmt Fluorid die Zerstörung der Citronensäure?* Mit Fluorid versetztes Blut wird 2 Stunden stehengelassen und dann auf Citronensäure untersucht:

Untersuchung sofort nach Blutentnahme	Untersuchung 2 Stunden später
0,065 mg	0,065
0,10 mg	0,10 mg

Durch das Stehenlassen mit Fluorid wird also die Citronensäurezerstörung gehemmt.

c) *Die Blutprobe wird enteiweißt und stehengelassen. Resultieren dieselben Werte?*

Citronensäuremenge sofort untersucht	Citronensäuremenge nach 24 und 48 Stunden untersucht
0,20 mg	0,20 mg
0,14 mg	0,14 mg

Die Citronensäure wird nach dem Enteiweißen nicht zerstört, auch nicht nach 24 und 48 Stunden.

d) *Um zu prüfen, ob die Blutwerte der Eichkurve entsprechend stimmen, wird der Blutprobe 0,3 mg Citronensäure zugegeben:*

Blut ohne zugegebene Citronensäure	Blutwerte + 0,3 mg Citronensäure
0,065 mg	0,365 m
0,095 mg	0,395 mg

Die zugefügte Citronensäure wird ganz wiedergefunden, so daß die Werte im Blut auch als richtig angesehen werden dürfen.

Eigentliche Versuche.

a) *Citronensäure-Bestimmungen im Blut bei Kindern von 0 Tagen bis 1 Jahr.*

Name	Alter	Abgeheilte Krankheit: (Rekonvaleszenzstadium)	Citronensäuremenge im Blut:
	0	Nabelschnurblut	2,0 mg ⁰ / _%
	0	Nabelschnurblut	2,6 mg ⁰ / _%
R. R.	1 Mt.	Dystrophie	1,3 mg ⁰ / _%
S. E.	1 ¹ / ₂ Mt.	Moro positiv	3,0 mg ⁰ / _%
E. W.	1 ¹ / ₂ Mt.	Abgeheilte Tetanie	2,05 mg ⁰ / _%

Name	Alter	Abgeheilte Krankheit: (Rekonvaleszenzstadium)	Citronensäuremenge im Blut:
B. H.	2 $\frac{1}{2}$ Mt.	Habituelles Erbrechen	2,3 mg 0 / $_0$
P. H.	3 Mt.	Habituelles Erbrechen	1,8 mg 0 / $_0$
Ch. F.	3 Mt.	Paratyphus	1,35 mg 0 / $_0$
D. Sch.	4 Mt.	Dyspepsie	2,1 mg 0 / $_0$
W. Sch.	4 Mt.	Enteritis	1,3 mg 0 / $_0$
J. L.	4 Mt.	Chron. Dyspepsie	2,3 mg 0 / $_0$
G. G.	4 Mt.	Pertussis	2,4 mg 0 / $_0$
C. S.	4 $\frac{1}{2}$ Mt.	Cerebralschaden	1,7 mg 0 / $_0$
B. A.	4 $\frac{1}{2}$ Mt.	Pyurie	3,0 mg 0 / $_0$
V. T.	5 Mt.	Scabies	1,65 mg 0 / $_0$
M. St.	6 Mt.	Encephalitis	2,6 mg 0 / $_0$
R. W.	6 $\frac{1}{2}$ Mt.	Abgeheilte Tetanie	1,34 mg 0 / $_0$
B. C.	6 $\frac{1}{2}$ Mt.	Abgeheilte Rachitis	2,1 mg 0 / $_0$
T. A.	7 $\frac{1}{2}$ Mt.	Chron. Dyspepsie	2,8 mg 0 / $_0$
B. F.	9 $\frac{1}{2}$ Mt.	Grippeotitis	1,6 mg 0 / $_0$
P. M.	10 Mt.	Toxoplasmose	1,92 mg 0 / $_0$
E. H.	10 Mt.	Scabies	1,65 mg 0 / $_0$

Die gefundenen 22 Werte liegen zwischen 1,3—3,0 mg 0 / $_0$.

b) Citronensäure-Bestimmungen im Blut bei Kindern von 1 bis 14 Jahren.

Name	Alter	Abgeheilte Krankheit: (Rekonvaleszenzstadium)	Citronensäuremenge im Blut:
R. A.	1 $\frac{1}{2}$ J.	Pertussis	1,48 mg 0 / $_0$
M. M.	3 $\frac{1}{2}$ J.	Pyelonephritis	1,44 mg 0 / $_0$
U. W.	4 $\frac{1}{2}$ J.	Di.	1,41 mg 0 / $_0$
R. W.	5 J.	Tbc.	2,0 mg 0 / $_0$
H. H.	5 $\frac{1}{2}$ J.	Di.	2,2 mg 0 / $_0$
R. A.	6 $\frac{1}{2}$ J.	Di.	1,95 mg 0 / $_0$
R. Sch.	7 J.	Di.	2,75 mg 0 / $_0$
R. H.	9 J.	Scharlach	1,6 mg 0 / $_0$
E. F.	11 $\frac{1}{2}$ J.	Di.	1,42 mg 0 / $_0$
F. G.	13 J.	Leichte Cystitis	1,2 mg 0 / $_0$
R. B.	13 $\frac{1}{2}$ J.	Di., ausgedehnte Osteomyelitis	2,3 mg 0 / $_0$

Die untersuchten Werte (11 Untersuchungen) liegen zwischen 1,2—2,75 mg 0 / $_0$.

c) *Citronensäure-Bestimmungen im Blut Erwachsener.* Es werden Vollblut und Plasma untersucht und aus den erhaltenen Daten die Werte in den Blutkörperchen nach folgender Formel berechnet:

Citronensäure in den Erythrocyten =

$$\frac{100 \cdot \text{Citratwert im Blut} - (\text{Hämatokritwert des Plasma} \cdot \text{Citratwert im Plasma})}{\text{Hämatokritwert im Blut}}$$

Name	Hämatokritwert	Vollblut	Plasma	Blutkörperchen
Sch.	42	1,65 mg ⁰ / ₀	2,06 mg ⁰ / ₀	1,08 mg ⁰ / ₀
Sch.	52	1,3 mg ⁰ / ₀	1,4 mg ⁰ / ₀	1,2 mg ⁰ / ₀
Sch.	52	1,8 mg ⁰ / ₀	2,7 mg ⁰ / ₀	0,97 mg ⁰ / ₀
R.	40	1,86 mg ⁰ / ₀	2,4 mg ⁰ / ₀	1,05 mg ⁰ / ₀
H.	46	1,3 mg ⁰ / ₀	1,6 mg ⁰ / ₀	0,95 mg ⁰ / ₀
W.	43	1,2 mg ⁰ / ₀	1,4 mg ⁰ / ₀	0,93 mg ⁰ / ₀
L.	55	1,2 mg ⁰ / ₀	1,55 mg ⁰ / ₀	0,94 mg ⁰ / ₀
M.	40	1,3 mg ⁰ / ₀	1,6 mg ⁰ / ₀	0,8 mg ⁰ / ₀
H.	40	2,0 mg ⁰ / ₀	2,8 mg ⁰ / ₀	0,8 mg ⁰ / ₀

Anämiefälle:

Hämolyt.

Icterus 14 2,0 mg⁰/₀ 2,2 mg⁰/₀ 0,75 mg⁰/₀

Aregenerator.

Anämie 16 2,6 mg⁰/₀ 2,95 mg⁰/₀ 0,75 mg⁰/₀

Die untersuchten Werte sind: Vollblut: 1,2—2,0 mg⁰/₀

Plasma: 1,4—2,8 mg⁰/₀

Blutkörperchen: 0,8—1,2 mg⁰/₀

d) *Citronensäure-Bestimmungen bei Rachitikern vor und nach dem Vitamin-D-Stoß von 600 000 E. (Ph = Phosphatase).*

Name	Alter	Krankheit	Blutwerte	Citrat vor ViD	Citrat nach ViD
K. T.	7 Mt.	Leichte Kraniotabes	Ca = 8,74 mg ⁰ / ₀	1,9 mg ⁰ / ₀	15 Tage n. ViD: 0,96 mg ⁰ / ₀
			P = 3,82 mg ⁰ / ₀		
			Ph = 23,73 E		
E. N.	2½ Mt.	Kraniotabes	Ca = 8,51 mg ⁰ / ₀	1,6 mg ⁰ / ₀	15 Tage n. ViD: 1,1 mg ⁰ / ₀
			P = 3,5 mg ⁰ / ₀		
			Ph = 26,12 E		
F. Z.	7 J.	ViD resistente R.	Ca = 10,28 mg ⁰ / ₀	4,8 mg ⁰ / ₀	20 Tage n. ViD: 3,0 mg ⁰ / ₀
			P = 1,62 mg ⁰ / ₀		
			Ph = 23,78 E		

Name	Alter	Krankheit	Blutwerte	Citrat vor ViD	Citrat nach ViD 40 Tage n. ViD : 2,75 mg ⁰ / ₀
R. W.	5 Mt.	Leichte Rachitis	Ca = 10,14 mg ⁰ / ₀ P = 3,18 mg ⁰ / ₀ Ph = 21,99 E	2,4 mg ⁰ / ₀	15 Tage n. ViD : 1,04 mg ⁰ / ₀
W. Sch.	5 1/2 Mt.	Leichte Rachitis	Ca = 7,12 mg ⁰ / ₀ P = 4,24 mg ⁰ / ₀ Ph = 50,8 E	2,9 mg ⁰ / ₀	9 Tage n. ViD : 1,65 mg ⁰ / ₀
F. P.	14 Mt.	Rachitis	Ca = 8,02 mg ⁰ / ₀ P = 3,86 mg ⁰ / ₀	3,0 mg ⁰ / ₀	20 Tage n. ViD : 1,7 mg ⁰ / ₀
L. J.	3 Mt.	Tetanie	Ca = 6,08 mg ⁰ / ₀ P = 4,76 mg ⁰ / ₀ Ph = 38,87 E	3,0 mg ⁰ / ₀	12 Tage n. ViD : 1,5 mg ⁰ / ₀
R. N.	2 Mt.	Latente Tetanie	Ca = 8,28 mg ⁰ / ₀ P = 4,29 mg ⁰ / ₀ Ph = 37,61 E	2,66 mg ⁰ / ₀	10 Tage n. ViD : 2,0 mg ⁰ / ₀
P. C.	1 Mt.	Latente Tetanie	Ca = 7,38 mg ⁰ / ₀ P = 5,71 mg ⁰ / ₀ Ph = 18,28 E	3,1 mg ⁰ / ₀	12 Tage n. ViD : 1,4 mg ⁰ / ₀
A. B.	4 Mt.	Latente Tetanie	Ca = 8,18 mg ⁰ / ₀ P = 3,82 mg ⁰ / ₀ Ph = 35,16 E	2,3 mg ⁰ / ₀	12 Tage n. ViD : 1,48 mg ⁰ / ₀
E. B.	4 Mt.	Rachitis	Ca = 9,14 mg ⁰ / ₀ P = 4,31 mg ⁰ / ₀ Ph = 26 E	2,3 mg ⁰ / ₀	18 Tage n. ViD : 1,4 mg ⁰ / ₀
Ch. L.	5 Mt.	Tetanie	Ca = 5,94 mg ⁰ / ₀ P = 6,5 mg ⁰ / ₀ Ph = 44,9 E	2,35 mg ⁰ / ₀	11 Tage n. ViD : 1,7 mg ⁰ / ₀
T. B.	3 Mt.	Rachitis	Ca = 9,88 mg ⁰ / ₀ P = 3,93 mg ⁰ / ₀ Ph = 16,14 E	2,3 mg ⁰ / ₀	15 Tage n. ViD : 1,5 mg ⁰ / ₀
F. T.	3 Mt.	Rachitis + Tetanie	Ca = 8,62 mg ⁰ / ₀ P = 5,87 mg ⁰ / ₀	2,0 mg ⁰ / ₀	15 Tage n. ViD : 1,7 mg ⁰ / ₀
C. H.	3 Mt.	Latente Tetanie	Ca = 7,04 mg ⁰ / ₀ P = 6,16 mg ⁰ / ₀ Ph = 39,34 E	2,2 mg ⁰ / ₀	8 Tage n. ViD : 1,8 mg ⁰ / ₀
U. G.	3 Mt.	Rachitis	Keine Werte	4,0 mg ⁰ / ₀	13 Tage n. ViD : 2,7 mg ⁰ / ₀
A. A.	8 Mt.	Latente Tetanie	Ca = 7,57 mg ⁰ / ₀ P = 3,0 mg ⁰ / ₀ Ph = 30,0 E	2,4 mg ⁰ / ₀	11 Tage n. ViD : 2,0 mg ⁰ / ₀
M. M.	6 1/2 Mt.	Rachitis + latente Tetanie	Ca = 9,3 mg ⁰ / ₀ P = 5,48 mg ⁰ / ₀ Ph = 42,2 E	3,9 mg ⁰ / ₀	13 Tage n. ViD : 3,2 mg ⁰ / ₀

Der höchste Wert von 4,8 mg⁰/₀ «vor dem Stoß» gehört einem Fall von perennierender Rachitis an, die auch auf Stoßdosen nur passager reagierte. Bei nicht mit Tetanie komplizierter Rachitis werden Werte von 1,6—4,0 mg⁰/₀ gefunden, bei Tetanie solche von 2,0—3,9 mg⁰/₀. In beiden Fällen liegt die untere und obere Grenze höher als bei nichtrachitischen und nichttetanischen Kindern.

Danach erfolgte die Berechnung der Mittelwerte mit Fehlergröße:

Kinder ohne Rachitis: $1,95 \pm 0,5 \text{ mg}^0/\text{0}$

Kinder mit Rachitis: $2,55 \pm 0,75 \text{ mg}^0/\text{0}$

Kinder mit Rachitis + Tetanie: $2,65 \pm 0,4 \text{ mg}^0/\text{0}$.

An Hand dieser Werte wird ein Vergleich gezogen zwischen rachitischen und nichtrachitischen Kindern, indem die Signifikanz berechnet wird (T-Test). Danach betragen die Werte von t jedoch nur 1,16 und 0,75. Es besteht also keine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Werten.

e) Citronensäure-Bestimmungen bei Kindern, denen Citronensäure zugefüttert und der Vitamin-D-Stoß gegeben wurde.

R. Pf.	3 Mt.	Rachitis	Ca = 6,28 mg ⁰ / ₀	4,0 mg ⁰ / ₀	9 Tage à 1 g Citronensäure: 4,0 mg ⁰ / ₀
		+ Tetanie	P = 2,98 mg ⁰ / ₀		22 Tage à 1 g Citronensäure: 4,0 mg ⁰ / ₀
M. T. R.	8 Mt.	Rachitis	Ca = 8,93 mg ⁰ / ₀	2,8 mg ⁰ / ₀	9 Tage à 1 g Citronensäure: 2,8 mg ⁰ / ₀
			P = 3,02 mg ⁰ / ₀		
			Ph = 13,61 E		
					22 Tage à 1 g Citronensäure: 2,8 mg ⁰ / ₀
					10 Tage nach ViD +
					32 Tage à 1 g Citronensäure: 2,8 mg ⁰ / ₀
					20 Tage nach ViD
					(Citronensäure abgesetzt): 2,0 mg ⁰ / ₀

Citronensäurewerte vor und nach dem Vitamin-D-Stoß.

Name	Citronensäure vor ViD	Citronensäure nach ViD	Differenz
K. T.	1,9 mg ⁰ / ₀	0,96 mg ⁰ / ₀	—0,94
E. N.	1,6 mg ⁰ / ₀	1,1 mg ⁰ / ₀	—0,50
F. Z.	4,8 mg ⁰ / ₀	2,75 mg ⁰ / ₀	—2,05
R. W.	2,4 mg ⁰ / ₀	1,04 mg ⁰ / ₀	—1,36
W. Sch.	2,9 mg ⁰ / ₀	1,65 mg ⁰ / ₀	—1,25

Name	Citronensäure vor ViD	Citronensäure nach ViD	Differenz
F. P.	3,0 mg ⁰ / ₀	1,7 mg ⁰ / ₀	—1,30
L. J.	3,0 mg ⁰ / ₀	1,5 mg ⁰ / ₀	—1,50
R. N.	2,66 mg ⁰ / ₀	2,0 mg ⁰ / ₀	—0,66
P. C.	3,1 mg ⁰ / ₀	1,4 mg ⁰ / ₀	—1,70
A. B.	2,3 mg ⁰ / ₀	1,48 mg ⁰ / ₀	—0,82
E. B.	2,3 mg ⁰ / ₀	1,4 mg ⁰ / ₀	—0,90
Ch. L.	2,35 mg ⁰ / ₀	1,7 mg ⁰ / ₀	—0,65
T. B.	2,3 mg ⁰ / ₀	1,5 mg ⁰ / ₀	—0,80
F. T.	2,0 mg ⁰ / ₀	1,7 mg ⁰ / ₀	—0,30
C. H.	2,2 mg ⁰ / ₀	1,8 mg ⁰ / ₀	—0,40
U. G.	4,0 mg ⁰ / ₀	2,7 mg ⁰ / ₀	—1,30
A. A.	2,4 mg ⁰ / ₀	2,0 mg ⁰ / ₀	—0,40
M. M.	3,9 mg ⁰ / ₀	3,2 mg ⁰ / ₀	—0,70

Der Mittelwert der Differenz beträgt: —0,97.

Wir betrachten diese Reihe für die Frage des Verhaltens der Blutcitronensäure bei der D-Avitaminose für wesentlicher als den Vergleich zwischen rachitischen und nichtrachitischen Kindern. Bei diesem wirken sich neben der D-Avitaminose zahlreiche endogene und exogene Faktoren aus, die *auch* auf die Citronensäure einwirken können. Vergleicht man aber jeweils innerhalb kurzer Frist die gleichen Kinder, so fallen diese Fehler weg und die Unterschiede werden beweiskräftig. *Wir stellen zunächst fest, daß bei den 18 Versuchen immer eine Verminderung der Citronensäure im Blut bei der Rachitisheilung sich ergibt.* Da das Ergebnis nicht ein einziges Mal in anderer Richtung geht, ist dies schon ein Beweis von hoher Wahrscheinlichkeit für die Signifikanz des Befundes. Quantitativ ergibt sich folgendes:

(Berechnung nach dem T-Test, wenn N klein ist.)

$$S_d = \sqrt{\frac{1}{N_1 + N_2 - 2} \cdot [\sum d_1^2 + \sum d_2^2]}$$

$$t = \frac{X_1 - X_2}{S_d} \cdot \sqrt{\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2}}$$

(N = Anzahl, d = Differenz vom Mittelwert, X = Mittelwert.)

In unserem Falle beträgt der Wert für $t = 4,18$. Dies zeigt, daß unser Befund als hoch signifikant bezeichnet werden darf und das Resultat dieser Untersuchungsreihe als statistisch begründet gelten kann.

Die Abnahme der Citronensäure nach großen Dosen Vitamin D dürfen wir hiernach als sichergestellt ansehen. Damit ist die Rolle der Citronensäure, bei Mangel an Vitamin D und bei schlechter Kalkresorption, analog dem Parathormon, aus dem Knochen Calcium zu mobilisieren, wahrscheinlich gemacht. Wenigstens können unsere Befunde mit dieser Hypothese als nicht im Widerspruch stehend bezeichnet werden.

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode zur Citronensäure-Bestimmung im Blut beschrieben (nach *Pucher*), bei der die Citronensäure in Pentabromaceton überführt und dieses nachgewiesen wird.

2. Es wird eine Eichkurve aufgestellt mit einem Fehler von $\pm 0,00077$.

3. Citronensäure wird im Blut von Kindern von 0—1 Jahr untersucht. Die gefundenen Werte liegen zwischen 1,3—3,0 mg% mit Mittelwert von $2,04 \pm 0,53$ mg%.

4. Citronensäure-Bestimmungen im Blute bei Kindern von 1 bis 14 Jahren. Gefunden werden 1,2—2,75 mg% Citronensäure mit Mittelwert von $1,88 \pm 0,49$ mg%.

5. Erwachsenenblut wird auf Citronensäure untersucht. Dabei findet man: Vollblut: 1,2—2,0 mg%

Plasma: 1,4—2,8 mg%

Die berechneten Blutkörperchen-Werte sind sehr konstant, sie liegen um 1 mg% herum, genau 0,8—1,2 mg%.

6. Die Unterschiede im Citronensäure-Gehalt rachitischen und nichtrachitischen Blutes sind beim Vergleich einer Reihe von 18 rachitischen Kindern mit 33 nichtrachitischen Fällen nicht signifikant. Ein exzessiv hoher Wert wurde bei einer vitaminresistenten Rachitis gefunden.

7. Citronensäure-Werte werden bei Rachitikern vor und nach dem Vitamin-D-Stoß untersucht. Es werden gefunden: Vor dem ViD-Stoß: 1,6—4,8 mg%; nach dem ViD-Stoß: 0,96—3,2 mg%. Der Mittelwert der Differenz beträgt: —0,97. Diese Differenz ist signifikant.

8. Citronensäure wird bestimmt bei einem Rachitiker, der während längerer Zeit konstante Mengen Citronensäure zugefüttert bekommt. Die Werte sind zu verschiedenen Zeitpunkten immer gleich, nämlich 4,0 mg%. Ferner ist die Citronensäure im Blute eines andren Rachitikers, der längere Zeit Citronensäure per os

ohne sonstige Therapie erhielt, immer konstant, nämlich 2,8 mg%. Nach dem Vitamin-D-Stoß wird bei diesem Fall Citronensäure weiter gegeben: Der Wert sinkt nicht. Später wird die Citronensäurezufuhr unterlassen, worauf der Citronensäurewert auf 2,0 mg% absinkt.

9. Die Untersuchungen ergeben als sicheres Resultat, daß der Citronensäurespiegel im Blut des rachitischen Kindes nach dem Vitaminstoß, d. h. mit dem Heilungsprozeß absinkt.

10. Mit den von *Rominger* entwickelten Vorstellungen, daß die Citronensäure den Mangel an Vitamin D teilweise zu kompensieren tendiere und daß ihre Vermehrung also einen Kompensationsmechanismus darstelle, lassen sich diese Befunde in Einklang bringen. Sie begründen aber nicht eine antirachitische Citronensäure-Therapie.

Summary.

Following the method evolved by *Pucher* citric acid estimations were made in healthy, in rachitic children and in rickety children who had been treated with vit. D. In the healthy children and the rickety ones the results vary round the same averages, but the values in the rickety children before the vit. D stoss therapy are (average) about 97 mg% higher than after the vit. D stoss, i.e. the citric acid level in the blood of the rachitic children decreases after the vit. D stoss. This decrease of citric acid after vit. D therapy shows its significance after statistical evaluation. A case of rickets which proved to be refractory against vit. D showed before the vit. D stoss the highest value of citric acid. This decreased temporarily after very large doses of vit. D.

Résumé.

Dosages de l'acide citrique par la méthode de *Pucher* chez des enfants sains, des enfants rachitiques et chez des enfants rachitiques ayant reçu de la Vitamine D. Dans les deux premiers groupes, les valeurs se trouvent réparties de façon sensiblement égale; toutefois, chez les rachitiques, ces taux avant le choc à la Vitamine D sont en moyenne de 0,97 mgr. % plus hauts qu'après le choc; le taux de l'acide citrique s'abaisse donc dans le sang des rachitiques après le choc à la Vitamine D. L'étude statistique des résultats indique que cet abaissement du taux citrique sous l'action de la Vitamine D₂ est significatif. Un cas de

rachitisme réfractaire au traitement vitaminique présenta constamment dans son sang la teneur d'acide citrique la plus élevée trouvée. Cette teneur s'abaissa passagèrement sous l'action de doses très élevées de vitamine.

Literatur.

- Albright u. Mitarbeiter, *Medicine* 25, 399 (1946). — Benjamin, H. R., u. Heß, J. *biol. chem. (Am.)* 100, 27 (1933). — Benjamin, H. R., J. *biol. chem. (Am.)* 109, 123 (1935). — Beumer, *Handbuch d. Kinderhk. Erg.-Bd. S. 177* (1942). — Day, J. *Nutr.* 20, 157 (1940). — Dickens, F., *Biochem. J. (Brit.)* 35, 1011 (1941). — Freudenberg, E., *Schweiz. med. Wschr.* 285 (1939 I); *Handbuch d. Kinderhk. Bd. 1, 4. Aufl.* 727 (1931). — Glanzmann, Meier, Walthard, Z. *Vitaminforsch. (Schwz.) Bd. 17, 159* (1946). — Greenberg, J. *biol. chem.* 99, 1 (1932—33). — Greenwald, J. J. *biol. chem.* 67, 1 (1926). — Hallmann, N., *Acta physiolog. scand. Vol. II. Suppl. IV* (1940). — Hamilton u. Dewar, *Amer. J. dis. childr.* 54, 548 (1937). — Hamilton u. Schwartz, *Amer. J. dis. childr.* 46, 669 (1935); 54, 548 (1937). — Hastings, Murray u. Sendroy, J. *biol. chem. (Am.)* 71, 723 (1926). — Hastings, McLean u. Mitarbeiter, J. *biol. chem. (Am.)* 107, 351 (1934). — Hathaway u. Meier, J. *Nutr. (Am.)* 17, 419 (1939). — Heinz, Müller, Rominger, *Zschr. f. Kinderhk. Bd. 65, 1./2. Heft* (1947). — Nikolaysen, *Biochem. J. (Brit.)* 31 (1937). — Nordbø, R., u. Scherstén, B., *Scand. Arch. Physiol.* 63, 124 (1931). — Pucher, G. W., Sherman, C. C., Vickery, H. B., J. *biol. chem.* 113 (1936). — Rominger, E., *Arch. Kinderhk.* 131, 53 (1944). — Shelling u. Maslow, J. *biol. chem. (Am.)* 78, 661 (1928). — Sherman, Landford, J. *Nutr.* 23, 293 (1942). — Shohl, J. *Nutr.* 14, 69 (1937); 17, 427 (1939). — Shohl u. Buttler, *New England J. med.* 220, 515 (1939). — Smith, Barnes u. Mitarbeiter, J. *Nutr.* 20, 255 (1940). — Thunberg, K. *Fysiogr. Söllsk. Lund* 11, Nr. 4 (1941); 11, Nr. 13 (1941). — Taussky, H. H., u. Shorr, E., J. *biol. chem.* 169, 1 (1947).